

Aus Dem Lehrstuhl Für Innere Medizin I
Leitung: Prof. Dr. med. B. Salzberger
Der Medizinischen Fakultät
Der Universität Regensburg

**Dichte CGRP-positiver und
Substanz P-positiver Nervenfasern bei
Rheumatoider Arthritis und Osteoarthrose**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Matthias Dirmeier

2011

Aus Dem Lehrstuhl Für Innere Medizin I
Leitung: Prof. Dr. med. B. Salzberger
Der Medizinischen Fakultät
Der Universität Regensburg

**Dichte CGRP-positiver und
Substanz P-positiver Nervenfasern bei
Rheumatoider Arthritis und Osteoarthrose**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Matthias Dirmeier

2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Bernhard Weber

Prof. Dr. Rainer Straub

Prof. Dr. Joachim Grifka

7. Januar 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Fragestellung	3
3	Patientenkollektiv und Methoden	3
3.1	Patientenkollektiv	3
3.2	Gewebeaufbereitung, Histologie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	5
3.3	Darstellung der Daten und Auswertung	8
4	Ergebnisse	8
4.1	Synoviale Entzündung	8
4.2	Dichte SP-positiver und CGRP-positiver Nervenfasern	9
4.3	Dichte sympathischer Nervenfasern und CGRP-positiver Nervenfasern	10
4.4	Dichte CGRP-positiver Nervenfasern und Entzündungsparameter und Medikation	14
5	Diskussion	15
6	Zusammenfassung	18
7	Literatur und Originalarbeit	19
8	Danksagung	29
9	Lebenslauf	30

1 Einleitung

Die wichtige Rolle von sensiblen Nervenfasern (NFs) und deren Hauptneurotransmitter Substanz P (SP) bei Gelenkentzündungen ist gut gezeigt (1-4). SP stimuliert viele proinflammatorische Prozesse, darunter die Sekretion von Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-12, Interferon- γ (IFN- γ), die Superoxidation-Produktion und die Chemotaxis verschiedener Zelltypen (5-12).

Neben SP wird auch calcitonin gene-related peptide (CGRP) in Synapsen sensibler Nerven gespeichert und von dort in die Peripherie abgegeben, zum Beispiel in die Synovia. Im Gegensatz zu SP hat CGRP eine ganze Reihe von antiinflammatorischen Effekten, wie zum Beispiel Hemmung der Freisetzung oxidativer Radikale in humanen Monozyten (13), Verhinderung der Antigenpräsentation durch humane Makrophagen und Langerhanszellen und Hemmung der Proliferation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen in hohen Konzentrationen (14-16). Zudem inhibiert CGRP IL-1 β aus stimulierten Langerhans-Zellen (15), TNF aus murinen Makrophagen (17) und IL-12 und IFN- γ aus humanen Monozyten (15, 18). Des Weiteren hemmt CGRP die Aktivität von Osteoklasten sowie die Knochenresorption (19, 20).

Angesichts dessen ist es wahrscheinlich, dass ein Übergewicht von SP gegenüber CGRP ein proinflammatorisches Signal bei Gelenkentzündung ist. Bei arthritischen Ratten und bei Patienten mit chronischer Rheumatoider Arthritis (RA) sind SP-positive Nervenfasern etwas vermehrt als

Zeichen einer Aussprossung sensibler Nervenfasern (21-23). Im Gegensatz dazu gehen sympathische Nervenfasern im Synovialgewebe von Patienten mit chronischer RA verloren.

Im Bezug auf CGRP-positive Nervenfasern ist die Lage nicht so klar wie bei SP. Verschiedene Forschungsgruppen publizierten in der Vergangenheit über die Dichte sensibler Nervenfasern bei arthritischen Ratten und bei Patienten mit RA; manche berichten über eine erhöhte Dichte, andere über eine verminderte Dichte sensibler Nervenfasern (3, 21, 24-26). Es ist denkbar, dass der Zeitpunkt der Untersuchung hinsichtlich der Phase der Arthritis eine wichtige Rolle spielt, denn im Verlauf der Entzündung wurden sowohl neuronale Degeneration als auch Regeneration von CGRP-positiven Nervenfasern nachgewiesen (27, 28). In den zuletzt genannten Studien wurde in der frühen Phase der Entzündung eine Abnahme CGRP-positiver Nervenfasern beobachtet sowie eine Regeneration in späteren Phasen, als die Entzündung zum Stillstand kam (27, 28). Ferner ist eine Bestimmung von SP und CGRP in der Synovialflüssigkeit höchstwahrscheinlich kein guter Parameter für das Vorhandensein eben dieser Nervenfasern, weil aktivierte nicht-neuronale Zellen ebenfalls in der Lage sind, diese beiden Neuropeptide zu produzieren (29, 30).

In den letzten Jahren wurden im Labor von Prof. Straub quantitative Verfahren angewandt, um die Dichte sensibler Nervenfasern in Synovialgewebe zu quantifizieren. Grundsätzliche Überlegungen zu diesen Verfahren entstammen einer großangelegten histologischen Studie mit RA Gewebe (31).

2 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Dichte CGRP-positiver Nervenfasern im Verhältnis zu SP-positiven Nervenfasern und zu sympathischen Nervenfasern in Synovialgewebe bei Patienten mit RA und OA zu untersuchen. Hierfür wurde oben genannte Technik zur gleichzeitigen Messung von CGRP-positiven, SP-positiven und sympathischen Nervenfasern im gleichen Patientengut angewendet. Um valide Ergebnisse zu bekommen, wurde eine große Kohorte an Patienten mit RA und OA untersucht.

3 Patientenkollektiv und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

25 Patienten mit chronischer RA und 35 Patienten mit chronischer OA, bei denen eine elektive Operation zum Kniegelenkserersatz durchgeführt wurde, wurden ohne weitere Vorauswahl in die Studie eingeschlossen. Die Diagnosestellung der RA war anhand der ACR Kriterien von 1987 erfolgt (32). Alle Patienten wurden über die Zielsetzung der Studie unterrichtet und erklärten schriftlich ihr Einverständnis gemäß der Deklaration von Helsinki. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt. Die Kenndaten der Patienten sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Laborwerte wie Rheumafaktor, Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und C-reaktives Protein (CRP) wurden mit Standardlabormethoden ermittelt. Histologische Marker der Entzündung

(siehe unter 3.2) wurden eingesetzt, um das Ausmaß der Entzündung bei Patienten mit RA, verglichen mit OA, näher bestimmen zu können.

Tabelle 1 Charakteristika der Patienten mit OA und RA

	OA	RA
Anzahl	35	25
Alter (Jahre)	71.5±1.0 [58-88]	66.8±2.1 [39-84]
Geschlecht (w/m)	27/8 (77/23)	20/5 (80/20)
Erkrankungsdauer (Jahre)	5.6±1.0	12.8±1.6*
Rheumafaktor	1 (2.9)	12 (48.0)**
BSG (Einstundenwert, in mm)	14.7±2.2	32.3±5.5*
CRP (mg/l)	5.6±0.7	26.3±0.6**
Dicke <i>lining layer</i> (Zellen)	2.0±0.1	4.4±0.4**
Zelldichte (Zellen/mm ²)	1077±82	1894±172**
T-Zell-Dichte (Zellen/mm ²)	15.2±3.5	58.2±15.0**
Makrophagen-Dichte (Zellen/mm ²)	37.6±5.3	93.7±16.0**
Vaskularisierung (Gefäße/mm ²)	30.2±3.2	30.9±3.2
Medikation		
NSAR	12 (34.3)	19 (76.0)*
Prednisolon	n.b.	15 (60.0)
Prednisolon (mg/d)	n.b.	4.4±1.0
Methotrexat	n.b.	4 (16.0)
Hydroxychloroquin	n.b.	4 (16.0)
Sulfasalazin	n.b.	3 (12.0)
Azathioprin	n.b.	1 (4.0)
Leflunomid	n.b.	5 (20.0)
Tramadol	1 (2.9)	5 (20.0)*

Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Prozentzahlen sind in runden Klammern und Spannweiten in eckigen Klammern angegeben. Für die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gilt: + p<0,05, * p<0,005, ** p<0,001. Abkürzungen: NSAR Nichtsteroidale Antirheumatika, n.b. nicht bestimmbar

3.2 Aufbereitung des Synovialgewebes, Histologie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Unmittelbar nach Eröffnung der Kniegelenkscapsel wurden die Gewebeproben entnommen. Die Aufbereitung der Gewebeproben für histologische Zwecke wurde bereits mehrfach beschrieben (22, 23). In Kurzfassung: Als Gewebeprobe wurde ein circa 9cm² großes Stück Synovialgewebe reseziert. Fettgewebe und Gewebe mit vielen Gefäßen wurde entfernt. Acht 1cm² große Stücke derselben Synovialgewebprobe wurden für die Histologie genutzt. Die Gewebeproben, für die eine Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und mit Alkalinphosphatase-Anti-Alkalinphosphatase (APAAP) beabsichtigt wurde, wurden sofort in ein schützendes Einfriermedium (Tissue Tek, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und dann auf flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Proben, die zur Detektion der Nervenfasern gedacht waren, wurden zunächst für 12-24 Stunden in einer 4% Formalin enthaltenden, mit Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (phosphate-buffered-saline, PBS) fixiert und danach für weitere 12-24 Stunden in PBS mit 20% Saccharose-Lösung (verdünnt in PBS) inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe in Tissue Tek eingebettet und tiefgefroren. Alle Proben wurden bei – 80° C aufbewahrt.

Die histologische Untersuchung wurde bereits in früheren Studien dargelegt (22, 23). In Kurzfassung: Aus den gefrorenen Proben wurden mittels eines Kryostaten (Microtom) 6-8µm dicke Gewebeschnitte angefertigt

und auf beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) übertragen. Zur Bestimmung der Zelldichte und der Dicke des *lining layer* wurde eine Standard HE Färbung mit circa 45 Schnitten angewandt. Zur Ermittlung der Dicke des *lining layer* wurde bei 400-facher Vergrößerung an neun verschiedenen Stellen die Zellzahl des *lining layer* gezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Die Zelldichte im Synovialgewebe wurde durch Auszählen aller positiv gefärbter Zellen in 17 zufälligen Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung ermittelt und in der Einheit Zellen/mm² wiedergegeben. Um die Anzahl an T-Zellen (CD3, Dako, Hamburg, Deutschland), Makrophagen (CD163, Dako) und Kapillargefäßen (Kollagen IV, Dako) im Synovialgewebe jedes Patienten zu bestimmen, wurden acht Gefrierschnitte mittels APAAP gefärbt und die jeweilige Anzahl an Strukturen in 17 zufälligen Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung gezählt, anschließend gemittelt und in der Einheit jeweilige Struktur/mm² wiedergegeben.

Die Methode zur Ermittlung synovialer Innervation wurde ebenfalls bereits in der Vergangenheit beschrieben (22, 23). Zur Detektion von Nervenfasern wurden Immunfluoreszenz-Färbungen angefertigt. Als primäre Antikörper wurden verwendet: Antikörper gegen Tyroxinhydroxylase (TH, Schlüsselenzym für die Noradrenalin-Produktion in sympathischen Nervenendigungen, polyklonal, Kaninchen, Chemicon, Temecula, USA), Antikörper gegen SP (polyklonal, Kaninchen, Chemicon) und Antikörper gegen CGRP (polyklonal, Kaninchen, Chemicon).

Als Sekundärantikörper wurde ein mit Alexa Fluor 546 konjugierter Mausantikörper verwendet, der gegen Kaninchen gerichtet ist (monoklo-

nal, *mouse anti-rabbit*, Molecular Probes, Invitrogen, Leiden, Niederlande), um Immunfluoreszenz der Nervenfasern zu erreichen.

Die Immunfluoreszenzfärbung am Beispiel von CGRP in Einzelschritten: Die Gewebeschnitte trockneten zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur und wurden dann für 10 Minuten in PBS rehydriert. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurde zunächst eine Blocklösung (10% Bovines Serumalbumin (BSA), 10% Chickenserum, 10% Fetales Kälberserum) auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Nach 45 Minuten erfolgte die Entfernung der Blocklösung und 3 mal fünfminütiges Waschen in PBS. Anschließend wurde der primäre Antikörper gegen CGRP (verdünnt 1:1000 in BSA 10%) aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur in einer Feuchthaltebox inkubiert. Die Schnitte für die Negativkontrolle wurden mit BSA 10% inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS für jeweils 5 Minuten. Als Sekundärantikörper wurde der Sekundärantikörper (verdünnt 1:500 in BSA 10%) aufgetragen und für 90 Minuten belassen. Nach erneutem 3 maligen Waschen für jeweils 5 Minuten mit PBS wurden auf die Schnitte zum Eindecken wenige Tropfen einer fluoreszenzverstärkenden Lösung (Fluorescence Mounting Medium, Dako, Glostrup, Dänemark) gegeben. Die Objektträger wurden anschließend über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag mikroskopisch ausgewertet.

Bei der mikroskopischen Auswertung wurden die Anzahl der Nervenfasern jeweils in 17 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern (bei 400-facher Vergrößerung) ausgezählt und anschließend der Mittelwert gebildet. Eine

Nervenfaser wurde dann als positiv gewertet, wenn sich eine perlschnurartige Struktur mit mindestens 3 Gliedern und mindestens 50µm Länge (anhand Skalierung im Mikroskop) darstellte. Die positive Färbung der Nervenfasern wurde dadurch überprüft, dass das Gewebe mit entsprechenden Kontrollantikörpern (Kaninchen Immunglobulin, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert wurde. Dies fiel stets negativ aus.

3.3 Darstellung der Daten und statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Häufigkeiten in zwei unterschiedlichen Gruppen wurden mittels Chi-Quadrat-Test verglichen. Wo möglich, wurde die Yates-Korrektur oder der Exakte Test nach Fisher verwendet (Tabelle 1). Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Korrelationen wurden mit der Spearman-Rang-Korrelations-Analyse berechnet (SPSS/PC, V.12.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Bei zusammengehörigen Proben der jeweiligen Patienten wurden Unterschiede mit dem Wilcoxon signed rank test (SPSS) untersucht. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ angesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Synoviale Entzündung bei Patienten mit RA und OA

Patienten mit chronischer RA wiesen einen dickeren *lining layer* auf als Patienten mit chronischer OA (Tabelle 1). Auch hatten Patienten mit chronischer RA im Vergleich zu Patienten mit OA eine erhöhte synoviale

Zelldichte, mehr synoviale T-Zellen und mehr synoviale Makrophagen (Tabelle 1). Dies spricht dafür, dass die synoviale Entzündung bei RA schwerer ist als bei OA.

4.2 Dichte SP-positiver und CGRP-positiver Nervenfasern

Bei Patienten mit RA war die Dichte SP-positiver Nervenfasern tendenziell höher als bei Patienten mit OA, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (Abbildung 1A). Dagegen war die Dichte CGRP-positiver Nervenfasern bei RA signifikant niedriger als bei OA (Abbildung 1B).

In einem direkten Vergleich der Dichte der beiden Nervenfasern war bei Patienten mit RA das Übergewicht von SP-positiver Nervenfasern über CGRP-positive Nervenfasern offensichtlich, jedoch nicht bei OA Patienten (Abbildungen 1C und 1D).

Um das eben beschriebene Übergewicht näher zu beschreiben, wurde das Verhältnis der Dichte der CGRP-positiven Nervenfasern zur Dichte der SP-positiven Nervenfasern berechnet (dimensionslose Größe). Dieses Verhältnis war bei RA Patienten niedriger als bei OA Patienten (Abbildung 2A). Dies liegt an der unterschiedlichen Dichte an CGRP positiven Nervenfasern (Abbildung 2A), denn die Dichte an SP-positiven Nervenfasern war nicht signifikant unterschiedlich bei RA und OA. Bei Patienten mit OA war der Median dieses Quotienten gleich 1 (Abbildung 2A), das bedeutet ein Gleichgewicht zwischen SP- und CGRP-positiven Nervenfasern in dieser Patientengruppe (Abbildung 2A). Bei RA war die Lage

völlig anders; hier war der Median bei 0.06, was einem Verhältnis von 16.7 SP-positiven Nervenfasern zu einer CGRP-positiven Nervenfaser entspricht (Abbildung 2A).

4.3 Dichte sympathischer Nervenfasern und CGRP-positiver Nervenfasern

Die Neurotransmitter der sympathischen Nervenfasern haben einen antiinflammatorischen Effekt auf arthritische Entzündung, wenn deren Konzentration hoch genug ist, um an β 2-adrenerge Rezeptoren (und A2 Adenosin Rezeptoren oder μ -Opioidrezeptoren) zu binden (33). In der untersuchten Kohorte von Patienten mit RA war die Dichte sympathischer Nervenfasern bedeutend niedriger als bei OA Patienten (Abbildung 2B). Allerdings erbrachte der direkte Vergleich der Dichte von TH-positiven und CGRP-positiven NF keinen statistisch signifikanten Unterschied bei OA Patienten (Abbildung 2C) und RA Patienten (Abbildung 2D). Außerdem ergab sich bei OA Patienten eine positive Korrelation zwischen der Dichte an CGRP-positiven Nervenfasern und der Dichte an sympathischen Nervenfasern (Abbildung 3A). Für RA Patienten ergab sich keine derartige Korrelation (Abbildung 3B).

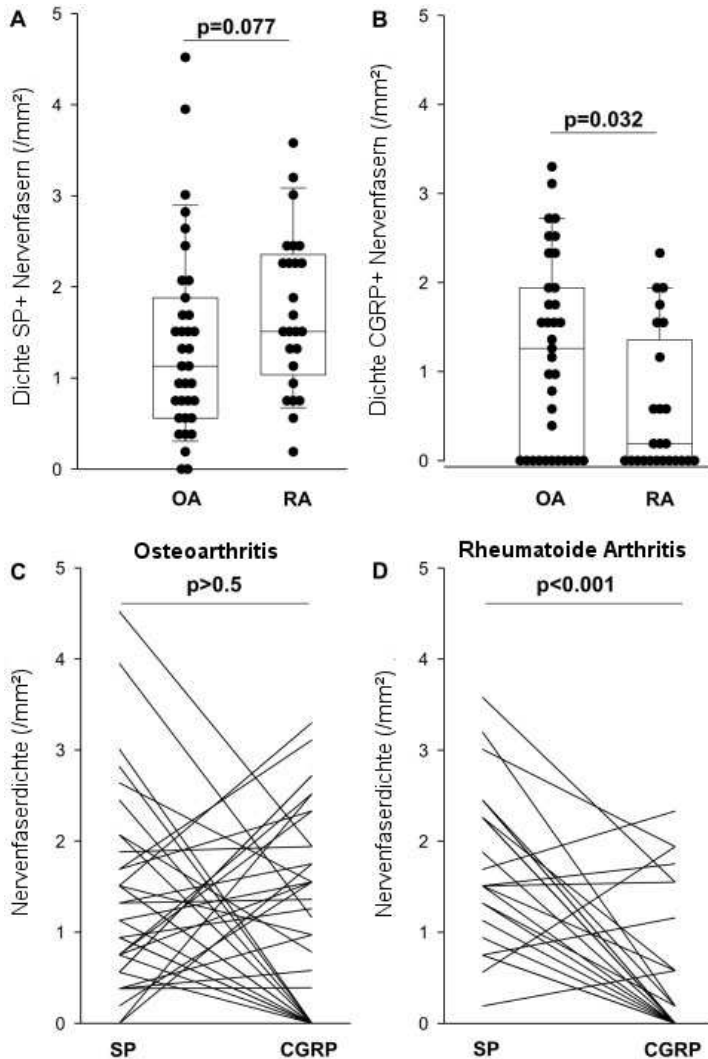


Abb.: 1: Dichte SP-positiver und CGRP-positiver Nervenfasern. **(A)** Vergleich SP-positiver Nervenfasern bei OA und RA. **(B)** Vergleich CGRP-positiver Nervenfasern bei OA und RA. Bei A und B entspricht jeder Punkt dem Wert eines Patienten, die Boxplots markieren die 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile: Vergleich der Gruppen mit Mann-Whitney-U-Test. **(C und D)** Direkter Vergleich der Dichte SP- und CGRP-positiver Nervenfasern bei Patienten mit OA (C) und RA (D). Jede Linie entspricht 2 Werten eines Patienten. Testung mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Proben.

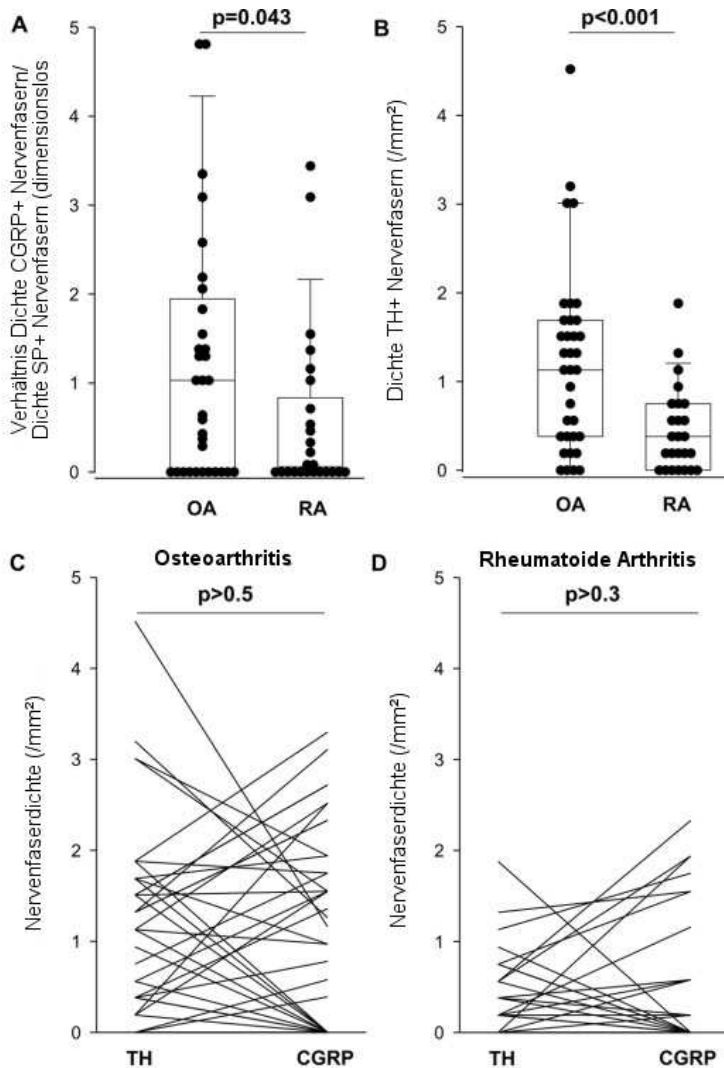


Abb.: 2: Dichte SP-positiver Nervenfasern, CGRP-positiver Nervenfasern und sympathischer Nervenfasern. **(A)** Vergleich der Dichte CGRP-positiver Nervenfasern (Zähler) geteilt durch Dichte SP-positiver Nervenfasern (Nenner) bei Patienten mit OA und RA. **(B)** Vergleich TH-positiver (sympathischer) Nervenfasern bei Patienten mit OA und RA. Bei (A) und (B) entspricht jeder Punkt dem Wert eines Patienten, die Boxplots markieren die 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile: Vergleich der Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test. **C** und **D**: Direkter Vergleich der Dichte TH-positiver und CGRP-positiver Nervenfasern bei Patienten mit OA (C) und RA (D). Jede Linie entspricht 2 Werten jeweils eines Patienten.

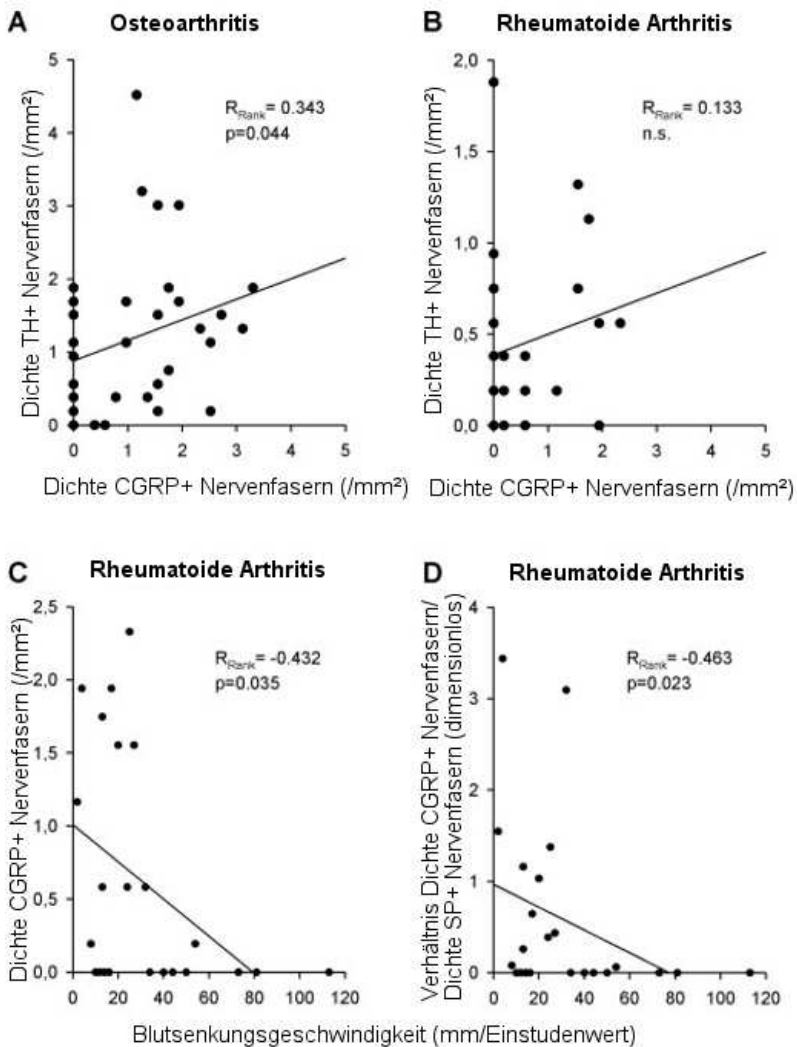


Abb.: 3: Wechselseitige Beziehung der Dichte CGRP-positiver und TH-positiver Nervenfasern (**A** und **B**), wechselseitige Beziehung der Blutsenkungsgeschwindigkeit und CGRP-positiven Nervenfasern (**C**) bzw. dem Quotienten von CGRP-positiver durch SP-positiver Nervenfasern (**D**). Ein Punkt symbolisiert einen Patienten. Abgebildet sind zudem jeweils die lineare Regressionsgerade, der Rangkorrelationskoeffizient und der P-Wert.

4.4 Dichte CGRP-positiver Nervenfasern und Entzündungsparameter und Medikation bei RA und OA

Bei den RA Patienten sowie auch bei den OA Patienten ergab sich jeweils keine Korrelation der Dichte CGRP-positiver Nervenfasern mit den Parametern Dicke des *lining layer*, Zelldichte, T-Zelldichte, Makrophagendichte, Gefäßversorgung und tägliche Prednisolondosis in Milligramm. Auch mit dem Quotient CGRP-positive Nervenfasern geteilt durch SP-positive Nervenfasern ergab sich keine Korrelation mit oben genannten Parametern (keine graphische Darstellung).

Nur bei RA Patienten fand sich eine negative Korrelation der BSG sowohl mit der Dichte an CGRP-positiven Nervenfasern (Abbildung 3C) als auch mit dem Quotienten CGRP-positiver geteilt durch SP-positiver Nervenfasern (Abbildung 3D). Es fand sich bei RA Patienten eine ähnliche Tendenz für den Zusammenhang zwischen CRP und der Dichte CGRP-positiver Nervenfasern ($R_{\text{Rank}}=-0.406$, $P=0.054$) beziehungsweise dem Quotient aus CGRP-positiven geteilt durch SP-positiven Nervenfasern ($R_{\text{Rank}}=-0.382$, $P=0.072$).

Eine Behandlung mit Nichtsteroidalen Antirheumatika, Prednisolon, Methotrexat, Hydroxychloroquin, Sulfasalazin, Azathioprin, Leflunomid oder Tramadol war nicht mit einer hohen oder niedrigen Dichte an CGRP-positiven Nervenfasern assoziiert, ebenso nicht mit einem hohen oder niedrigen Quotienten von CGRP-positiven geteilt durch SP-positiven Nervenfasern (keine graphische Darstellung).

5 Diskussion

In dieser Studie über synoviales Gewebe, in welcher ein großes Kollektiv von Patienten mit RA und OA untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass bei RA ein Übergewicht von SP-positiven Nervenfasern im Vergleich zu CGRP-positiven Nervenfasern besteht, jedoch nicht bei OA. Alle Nervenfasertypen wurden bei jeweils ein und demselben Patienten untersucht, um deren Dichte im direkten Vergleich zu sehen. Aus den Ergebnissen lässt sich höchstwahrscheinlich auf eine pro-inflammatorische Konstellation schließen, da die entzündungsfördernde Wirkung von SP sowie die entzündungshemmende Wirkung von CGRP und sympathischen Neurotransmittern auf das Immunsystem in der Vergangenheit gezeigt wurden (5-18, 33). Ferner wurde ein günstiger Einfluss von CGRP auf Knochenresorptionsprozesse durch die Hemmung der Aktivierung von Osteoklasten beschrieben (19, 20).

Diese Studie zeigt zudem, dass bei OA ein Gleichgewicht zwischen SP-positiven und CGRP-positiven Nervenfasern besteht und dass bei RA dieses Verhältnis stark verschoben ist – weg von CGRP und hin zu SP (Abbildung 3A). So kommen bei der RA auf eine CGRP-positive Nervenfasern gleich 17 SP-positive Nervenfasern, bei OA hingegen ist das Verhältnis 1:1.

Dieses starke Missverhältnis bei der RA übersteigt überraschenderweise sogar das vor einiger Zeit beschriebene Übergewicht von SP-positiven gegenüber sympathischen Nervenfasern; hier lag das Verhältnis bei 8:1 (23).

Folglich sind die lokalen Konzentrationen wichtiger anti-inflammatorischer Neurotransmitter wie CGRP von sensiblen Nervenfasern, sowie Noradrenalin, Adenosin und endogene Opiode aus sympathischen Nervenfasern inadäquat niedrig im Verhältnis zur Konzentration an proinflammatorischem SP aus sensiblen Nervenfasern. Diese Aussagen können nur für länger bestehende Erkrankung getroffen werden. Die Sachlage in frühen Stadien der RA und der OA ist nicht bekannt. Jedoch traten im Tiermodell derartige entzündungs-assoziierte Umverteilungen der Nervenfasern früh im Krankheitsverlauf auf (28). Ähnliche Veränderungen wären daher auch bei der RA und OA beim Menschen anzunehmen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass unterschiedliche Regulationsmechanismen für CGRP und SP in sensiblen Nervenfasern existieren, und dass diese vermutlich von der lokalen und/oder systemischen Entzündungssituation abhängen (siehe den Zusammenhang von BSG und Nervenfaserdichte in den Abbildungen 3C und 3D).

Eine weitere wichtige Studie zeigte, dass sensible Fasern des Nervus vagus in Anwesenheit von Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF) mehr SP als CGRP produzieren, in Abwesenheit dessen jedoch weniger (34). Obwohl eine andere Studie diesen modulierenden Effekt des NGF nicht bestätigte (35), ist denkbar, dass zusätzliche Faktoren zusammen mit NGF einen wichtiger Stimulus für das Ungleichgewicht der beiden sensiblen Neuropeptide darstellen. Weil NGF in entzündetem Synovialgewebe im Überfluss hergestellt wird (36-39), könnte das beobachtete Überwiegen von SP über CGRP von der Anwesenheit von NGF und anderen proinflammatorischen Molekülen abhängen.

Schließlich wurde eine positive Korrelation zwischen der Dichte CGRP-positiver und sympathischer Nervenfasern bei OA beobachtet, was aufgrund oben genannter Effekte der einzelnen Neurotransmitter als anti-inflammatorisches Signal interpretiert werden kann. Eine positive Korrelation war bei Synovialgewebe der Patienten mit RA nicht auszumachen, was einen ausgeprägten Mangel an sympathischen Nervenfasern anzeigt (y-Achse in Abbildung 3). Folglich ist denkbar, dass bei OA das gleichzeitige Vorhandensein der beiden antiinflammatorischen Signalwege den entzündlichen Prozess abschwächt. Diese Konstellation ist bei RA jedoch verloren gegangen. Dies wäre ein weiteres Beispiel für ein neuro-endokrines „uncoupling“.

6 Zusammenfassung

Sensible NF enthalten zwei wesentliche Neuropeptide, SP und CGRP. Die proinflammatorische Rolle von SP ist bekannt. CGRP hat antiinflammatorische Effekte, indem es T-Helferzellen Typ 1 Zytokine, die TNF Sekretion und die Leukozytenproliferation inhibiert. Die Zunahme von SP-positiven Fasern bei RA im Vergleich zu OA wurde bereits gezeigt. Diese Arbeit untersuchte die Dichte CGRP-positiver NFs im Vergleich zu SP-positiven oder sympathischen NFs in Synovialgewebe von Patienten mit RA und OA. Mittels Immunfluoreszenz-Färbungen von Synovialgewebe von 25 RA Patienten und 35 OA Patienten wurden die CGRP-positiven, SP-positiven und TH-positiven (sympathischen) Nervenfasern quantifiziert.

Die Dichte CGRP-positiver NFs war bei OA höher als bei RA, und die Dichte SP-positiver NFs war tendenziell höher bei RA. Bei RA Patienten fanden sich im Vergleich von CGRP-positiven zu SP-positiven NF beim selben Patientengut weniger CGRP-positive NF als SP-positive NF.

Das Verhältnis CGRP-positiver NFs zu SP-positiven NFs war bei RA niedriger als bei OA. Bei OA, aber nicht bei RA ergab sich eine positive Korrelation der Dichte CGRP-positiver NFs mit der Dichte sympathischer NFs, welche bei RA viel niedriger war.

Das Überwiegen SP-positiver NFs über CGRP-positive NFs oder sympathische NF fördert wahrscheinlich die proinflammatorischen Vorgänge bei Patienten mit RA. Die Gründe für den Verlust von CGRP in sensiblen Nervenfasern sind nicht bekannt.

7 Literatur

- 1 Levine JD, Clark R, Devor M, Helms C, Moskowitz MA, Basbaum AI. Intra-neuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science* 1984;226:547–9.
- 2 Lotz M, Carson DA, Vaughan JH. Substance P activation of rheumatoid synovocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science* 1987;235:893–5.
- 3 Mapp PI, Kidd BL, Gibson SJ et al. Substance P-, calcitonin gene-related peptide and C-flanking peptide of neuropeptide Y-immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis. *Neuroscience* 1990;37:143–53.
- 4 Garrett NE, Mapp PI, Cruwys SC, Kidd BL, Blake DR. Role of substance P in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1014–8.
- 5 Wagner F, Fink R, Hart R, Dancygier H. Substance P enhances interferon-gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. *Regul Pept* 1987;19:355–64.
- 6 Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988;241:1218–21.
- 7 Wiedermann CJ, Wiedermann FJ, Apperl A, Kieselbach G, Konwalinka G, Braunsteiner H. In vitro human polymorphonuclear leukocyte chemokinesis and human monocyte chemotaxis are different activities of aminoterminal and carboxyterminal substance P. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1989;340:185–90.
- 8 Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA. Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J Immunol* 1993;150:4478–85.

- 9 Kavelaars A, Broeke D, Jeurissen F et al. Activation of human monocytes via a non-neurokinin substance P receptor that is coupled to Gi protein, calcium, phospholipase D, MAP kinase, and IL-6 production. *J Immunol* 1994;153:3691–9.
- 10 Serra MC, Calzetti F, Ceska M, Cassatella MA. Effect of substance P on superoxide anion and IL-8 production by human PMNL. *Immunology* 1994;82:63–9.
- 11 Kincy-Cain T, Bost KL. Substance P-induced IL-12 production by murine macrophages. *J Immunol* 1997;158:2334–9.
- 12 Tanabe T, Otani H, Mishima K, Ogawa R, Inagaki C. Mechanisms of oxyradical production in substance P stimulated rheumatoid synovial cells. *Rheumatol Int* 1996;16:159–67.
- 13 Nong YH, Titus RG, Ribeiro JM, Remold HG. Peptides encoded by the calcitonin gene inhibit macrophage function. *J Immunol* 1989;143:45–9.
- 14 Casini A, Geppetti P, Maggi CA, Surrenti C. Effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP), neurokinin A and neurokinin A (4-10) on the mitogenic response of human peripheral blood mononuclear cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1989;339:354–8.
- 15 Torii H, Hosoi J, Beissert S et al. Regulation of cytokine expression in macrophages and the Langerhans cell-like line XS52 by calcitonin gene-related peptide. *J Leukoc Biol* 1997;61:216–23.
- 16 Hosoi J, Murphy GF, Egan CL et al. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 1993;363:159–63.
- 17 Feng Y, Tang Y, Guo J, Wang X. Inhibition of LPS-induced TNF-alpha production by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages. *Life Sci* 1997;61:L7.
- 18 Fox FE, Kubin M, Cassin M et al. Calcitonin gene-related peptide inhibits proliferation and antigen presentation by human peripheral blood mononuclear

- cells: effects on B7, interleukin 10, and interleukin 12. *J Invest Dermatol* 1997;108:43–8.
- 19 Zaidi M, Chambers TJ, Gaines Das RE, Morris HR, MacIntyre I. A direct action of human calcitonin gene-related peptide on isolated osteoclasts. *J Endocrinol* 1987;115:511–8.
- 20 D'Souza SM, MacIntyre I, Girgis SI, Mundy GR. Human synthetic calcitonin gene-related peptide inhibits bone resorption in vitro. *Endocrinology* 1986;119:58–61.
- 21 Ahmed M, Bjurholm A, Schultzberg M, Theodorsson E, Kreicbergs A. Increased levels of substance P and calcitonin gene-related peptide in rat adjuvant arthritis. A combined immunohistochemical and radioimmunoassay analysis. *Arthritis Rheum* 1995;38:699–709.
- 22 Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 2000;14:2097–107.
- 23 Weidler C, Holzer C, Harbuz M et al. Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis* 2005;64:13–20.
- 24 Weihe E, Nohr D, Schafer MK et al. Calcitonin gene related peptide gene expression in collagen-induced arthritis. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:1015–9.
- 25 Pereira da Silva JA, Carmo-Fonseca M. Peptide containing nerves in human synovium: immunohistochemical evidence for decreased innervation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1990;17:1592–9.

- 26 Kontinen YT, Rees R, Hukkanen M et al. Nerves in inflammatory synovium: immunohistochemical observations on the adjuvant arthritis rat model. *J Rheumatol* 1990;17:1586–91.
- 27 Kimberly CL, Byers MR. Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin gene-related peptide and axonal sprouting. *Anat Rec* 1988;222:289–300.
- 28 Imai S, Tokunaga Y, Kontinen YT, Maeda T, Hukuda S, Santavirta S. Ultra-structure of the synovial sensory peptidergic fibers is distinctively altered in different phases of adjuvant induced arthritis in rats: ultramorphological characterization combined with morphometric and immunohistochemical study for substance P, calcitonin gene related peptide, and protein gene product 9.5. *J Rheumatol* 1997;24:2177–87.
- 29 Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol* 1997;159:5654–60.
- 30 Hastings RH, Hua XY. Expression of calcitonin gene-related peptide by cultured rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:563–9.
- 31 Bresnihan B, Cunnane G, Youssef P, Yanni G, Fitzgerald O, Mulherin D. Microscopic measurement of synovial membrane inflammation in rheumatoid arthritis: proposals for the evaluation of tissue samples by quantitative analysis. *Br J Rheumatol* 1998;37:636–42.
- 32 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315–24.
- 33 Straub RH, Härle P. Sympathetic neurotransmitters in joint inflammation. *Rheum Dis Clin North Am* 2005;31:43–59, viii.

- 34 MacLean DB, Bennett B, Morris M, Wheeler FB. Differential regulation of calcitonin gene-related peptide and substance P in cultured neonatal rat vagal sensory neurons. *Brain Res* 1989;478:349–55.
- 35 Lindsay RM, Lockett C, Sternberg J, Winter J. Neuropeptide expression in cultures of adult sensory neurons: modulation of substance P and calcitonin gene-related peptide levels by nerve growth factor. *Neuroscience* 1989;33:53–65.
- 36 Manni L, Lundeberg T, Fiorito S, Bonini S, Vigneti E, Aloe L. Nerve growth factor release by human synovial fibroblasts prior to and following exposure to tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and cholecystokinin-8: the possible role of NGF in the inflammatory response. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:617–24.
- 37 Halliday DA, Zettler C, Rush RA, Scicchitano R, McNeil JD. Elevated nerve growth factor levels in the synovial fluid of patients with inflammatory joint disease. *Neurochem Res* 1998;23:919–22.
- 38 Falcini F, Matucci CM, Lombardi A et al. Increased circulating nerve growth factor is directly correlated with disease activity in juvenile chronic arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996;55:745–8
- 39 Aloe L, Tuveri MA, Carcassi U, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;35:351–5

Lower density of synovial nerve fibres positive for calcitonin gene-related peptide relative to substance P in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis

M. Dirmeier¹, S. Capellino¹, T. Schubert², P. Angele³, S. Anders⁴ and R. H. Straub¹

Objectives. Sensory nerve fibres (NFs) contain two major neuropeptides, substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP). The pro-inflammatory role of SP is known, while CGRP has anti-inflammatory activities by inhibiting T helper type 1 cytokines, TNF secretion and leucocyte proliferation. We demonstrated the increase of SP-positive NFs in RA as compared with OA. This study investigated the density of CGRP-positive NFs relative to SP-positive NFs or sympathetic NFs in synovial tissue of patients with RA and OA.

Methods. By immunofluorescent staining of synovial tissue of 25 patients with RA and 35 patients with OA, NFs positive for CGRP, SP and tyrosine hydroxylase (sympathetic NFs) were quantified.

Results. Density of CGRP-positive NFs was higher in OA than in RA, and density of SP-positive NFs tended to be higher in RA. In RA patients, comparison of CGRP-positive and SP-positive NFs in the same synovial tissue demonstrated less CGRP-positive than SP-positive NFs. The ratio of CGRP-positive NFs to SP-positive NFs was lower in RA as compared with OA. In OA, but not in RA, density of CGRP-positive NFs positively correlated with density of sympathetic NFs, which is much lower in RA patients.

Conclusion. The preponderance of SP-positive NFs over CGRP-positive NFs or sympathetic NFs most probably supports the pro-inflammatory process in patients with RA. The reasons for the loss of CGRP in sensory NFs are not known.

KEY WORDS: Rheumatoid arthritis, Calcitonin gene-related peptide, SP, Sensory nerve fibre, Sympathetic nerve fibre, Tyrosine hydroxylase.

Introduction

In arthritic inflammation, the importance of sensory nerve fibres (NFs) and their main neurotransmitter, substance P (SP), has been documented [1–4]. SP stimulates many pro-inflammatory aspects such as secretion of TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , superoxide anion production and chemotaxis of different cell types [5–12]. Along with SP, calcitonin gene-related peptide (CGRP) is stored in and released from sensory nerve terminals in the periphery, e.g. in the synovium. In contrast to SP, CGRP exerts several anti-inflammatory effects such as inhibition of the oxidative burst in human monocytes [13], inhibition of antigen presentation by human macrophages and Langerhans cells and proliferation of human peripheral blood mononuclear cells at high concentrations [14–16] and inhibition of IL-1 β from stimulated Langerhans cells [15], TNF from murine macrophages [17] and IL-12 and IFN- γ from human monocytes [15, 18]. In addition, CGRP inhibits osteoclast activity and bone resorption [19, 20]. Thus, a possible preponderance of SP over CGRP will probably be a pro-inflammatory signal in arthritis.

In arthritic rats and in patients with chronic RA, SP-positive NFs are somewhat increased as a sign of sensory NF sprouting [21–23]. In contrast, sympathetic NFs are lost in synovial tissue of patients with chronic RA [22, 23]. With respect to CGRP-positive NFs, the situation is not as clear as with SP because either increased or decreased densities of these NFs have been reported by different groups in arthritic rats and patients with RA [3, 21, 24–26]. It might be that the time point of investigation in relation

to the phase of arthritis plays an important role because neuronal degeneration and regeneration have been demonstrated for CGRP NFs during the course of inflammation [27, 28]. In these latter studies, a decrease of CGRP-positive NFs was observed in the early phase of inflammation but a regeneration appeared in later phases when the inflammatory process came to a halt [27, 28]. In addition, determination of SP and CGRP in the synovial fluid is most probably not a good indicator for the presence of these NFs because activated non-neuronal cells are able to produce both neuropeptides [29, 30].

In recent years, we applied a laborious quantitative technique in order to measure the density of NFs in synovial tissue, which was adapted from an extensive histological study of RA synovium [31]. The aim of the present study was to apply this technique to the parallel measurement of CGRP-positive NFs together with SP-positive and sympathetic NFs in the material of the same patient. In order to validate our findings, we investigated a large cohort of patients with chronic RA compared with patients with chronic OA.

Patients and methods

Patients

Twenty-five patients with chronic RA and 35 patients with chronic OA, who underwent elective knee joint replacement surgery, were included without further selection. Diagnosis of RA was based on the established ACR criteria [32]. All patients were informed about the purpose of the study and gave written consent according to the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Ethical Committee of the University of Regensburg. Clinical and laboratory data for the entire group are presented in Table 1. Variables such as rheumatoid factor, erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein were measured by standard techniques. Histological markers of inflammation (see below for techniques) were used in order to delineate the inflammatory situation in RA patients as compared with OA.

M. Dirmeier and S. Capellino contributed equally to this work.

¹Laboratory of Experimental Rheumatology and Neuroendocrino-Immunology, Department of Internal Medicine I, University Hospital, ²Department of Pathology, ³Department of Trauma Surgery and ⁴Department of Orthopedic Surgery, University of Regensburg, Regensburg, Germany.

Submitted 3 July 2007; revised version accepted 10 October 2007.

Correspondence to: R. H. Straub, Professor of Experimental Medicine, Laboratory of Experimental Rheumatology and Neuroendocrino-Immunology, Department of Internal Medicine I, University Hospital, 93042 Regensburg, Germany. E-mail: rainer.straub@klinik.uni-regensburg.de

TABLE 1. Characteristics of patients with OA and RA

	OA	RA
Number	35	25
Age (yrs)	71.5 \pm 1.0 [58–88]	66.8 \pm 2.1 [39–84]
Women/men, n (%)	27/8 (77/23)	20/5 (80/20)
Duration (yrs)	5.6 \pm 1.0	12.8 \pm 1.6*
Rheumatoid factor, n (%)	1 (2.9)	12 (48.0)**
Erythrocyte sedimentation rate (mm 1st h)	14.7 \pm 2.2	32.3 \pm 5.5*
C-reactive protein (mg/l)	5.6 \pm 0.7	26.3 \pm 0.6**
Lining layer thickness (cells)	2.0 \pm 0.1	4.4 \pm 0.4**
Cellular density (cells/mm ²)	1077 \pm 82	1894 \pm 172**
T-cell density (cells/mm ²)	15.2 \pm 3.5	58.2 \pm 15.0**
Macrophage density (cells/mm ²)	37.6 \pm 5.3	93.7 \pm 16.0**
Vascularity (vessels/mm ²)	30.2 \pm 3.2	30.9 \pm 3.2
Medication		
NSAIDs, n (%)	12 (34.3)	19 (76.0)*
Prednisolone, n (%)	NA	15 (60.0)
Prednisolone (mg/day)	NA	4.4 \pm 1.0
Methotrexate, n (%)	NA	4 (16.0)
Hydroxychloroquine, n (%)	NA	4 (16.0)
Sulfasalazine, n (%)	NA	3 (12.0)
Azathioprine, n (%)	NA	1 (4.0)
Leflunomide, n (%)	NA	5 (20.0)
Tramadol, n (%)	1 (2.9)	5 (20.0)*

Data are given as mean \pm S.E.M, percentages in square parentheses and ranges in brackets. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ and *** $P < 0.001$ for the difference between the two groups. NA, not applicable.

Synovial tissue preparation, histology, immunohistochemistry and immunofluorescence

Synovial tissue samples were obtained immediately after opening the knee joint capsule. The preparation of the tissue for histology was as previously described [22, 23]. Briefly, one piece of $\sim 9 \text{ cm}^2$ of synovial tissue was dissected. Fat tissue and tissue with a large number of vessels were removed. Eight $\sim 1 \text{ cm}^2$ pieces of the same synovial area were used for histology. The samples intended for haematoxylin-eosin (HE) and alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP) staining were immediately placed in protective freezing medium (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, The Netherlands) and then quick-frozen by floating on liquid nitrogen. The tissue samples used for the detection of NFs were fixed for 12–24 h in phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% formaldehyde and then incubated in PBS with 20% sucrose for 12–24 h. The tissue was then bedded in Tissue-Tek and quick-frozen. Each patient's samples of synovial tissue were stored at -80°C .

Histological evaluation of inflammation has been described in earlier studies [22, 23]. Briefly, the frozen tissue samples were cut into $6\text{--}8 \mu\text{m}$ thick sections and cell density and lining layer thickness were evaluated using a standard HE staining of ~ 45 sections. At a magnification of $\times 400$, the extent of the lining layer thickness was determined by averaging the number of cells in a lining layer cross section at nine different locations. The cell density in the synovial tissue was determined by counting all stained cells in 17 randomly selected high-power fields ($\times 400$) and expressed per square millimetre. In order to determine the number of T cells (CD3, Dako, Hamburg, Germany), macrophages (CD163, Dako) and capillary vessels (collagen IV, Dako) in the synovial tissue of each patient, eight cryosections were investigated using APAAP staining and the number of identified structures was averaged from 17 randomly selected high-power fields ($\times 400$) and expressed per square millimetre.

Determination of synovial innervation has been extensively described in earlier studies [22, 23]. Briefly, six to eight $7\text{--}9 \mu\text{m}$ thick cryosections were used for immunofluorescence staining with primary antibodies against tyrosine hydroxylase (TH, the key enzyme for noradrenaline production in sympathetic

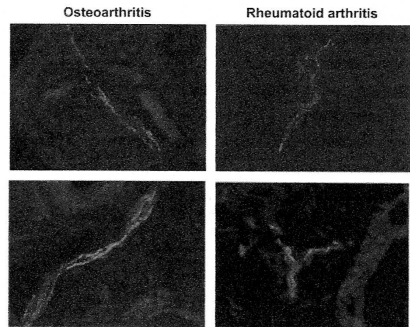


Fig. 1. Immunofluorescent staining of CGRP-positive NFs. The images show synovial tissue of two patients with OA (left) and two patients with RA (right). In all panels, large CGRP-positive NFs are demonstrated that follow vascular structures. Apart from this vascular staining, small NFs branch into the surrounding tissue. These latter NFs have been counted as outlined in the Patients and methods section. Original magnification: $\times 400$.

nerve endings, polyclonal, rabbit, Chemicon, Temecula, USA), SP (polyclonal, rabbit, Chemicon) and CGRP (polyclonal, rabbit, Chemicon). An Alexa Fluor 546-conjugated secondary antibody (monoclonal, mouse anti-rabbit, Molecular Probes, Invitrogen, Leiden, The Netherlands) was used to achieve immunofluorescent staining of these NFs. Figure 1 gives an example of CGRP-positive NFs in synovial tissue of two patients with RA and two patients with OA. The numbers of positive NFs per square millimetre were determined by averaging the number of stained NFs (minimum length $50 \mu\text{m}$, determined through a micrometre eyepiece) in 17 randomly selected high-power fields of view ($\times 400$). We controlled the positive NF staining by incubating the tissue with respective control antibodies (rabbit immunoglobulin, Sigma, Deisenhofen, Germany), which always yielded a negative result.

Presentation of data and statistical analysis

The values are given as mean \pm S.E.M. (Table 1). Frequencies in two different groups were compared by the chi-squared test using Yates' continuity correction or Fisher's exact test if possible (Table 1). Groups were compared by the Mann-Whitney U-test, and correlations were calculated by Spearman rank correlation analysis (SPSS/PC, V.12.0, SPSS Inc., Chicago, USA). In paired samples of the same patients, a difference was detected using the Wilcoxon signed rank test (SPSS). $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Synovial inflammation in patients with RA and OA

Patients with chronic RA demonstrated a thicker lining layer than did patients with chronic OA (Table 1). RA patients also presented an increased synovial cellular density, more synovial T cells and more synovial macrophages as compared with OA (Table 1). This indicates a more severe synovial inflammation in RA as compared with OA patients.

Density of SP-positive and CGRP-positive NFs

In patients with chronic RA, the density of SP-positive NFs tended to be higher as compared with OA, without reaching

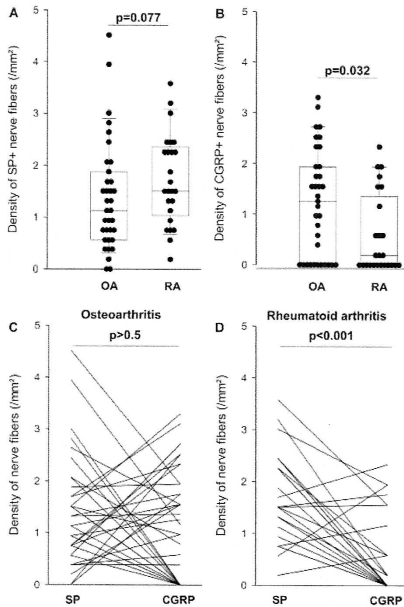


Fig. 2. Density of SP-positive and CGRP-positive NFs. (A) Comparison of SP-positive NFs in patients with OA and RA. (B) Comparison of CGRP-positive NFs in patients with OA and RA. In panels (A) and (B), every symbol represents the value of one patient and box plots represent the 10th, 25th, 50th (median), 75th and 90th percentiles. Groups were compared by the Mann-Whitney U-test. (C and D) Direct comparison of the densities of SP-positive and CGRP-positive NFs in individual patients with OA (C) and RA (D). Every line represents the two values of an individual patient. Difference was tested using the Wilcoxon signed rank test for paired samples.

the significance level (Fig. 2A). In contrast, density of CGRP-positive NFs was significantly lower in patients with chronic RA compared with chronic OA (Fig. 2B). In a direct comparison of the density of NFs in the same patient, the preponderance of SP-positive NFs over CGRP-positive NFs was obvious in RA patients but not in patients with OA (Fig. 2C and D). In order to delineate this preponderance of SP-positive NFs over CGRP-positive NFs, we calculated the ratio of the density of CGRP-positive NFs to SP-positive NFs (a ratio without a unit). It turned out that this ratio was lower in patients with chronic RA as compared with OA (Fig. 3A). This is due to the fact that CGRP-positive fibres were lower in relation to SP-positive fibres in RA compared with OA patients (Fig. 3A), given that SP-positive fibres did not differ significantly between groups. Since the median of this ratio was 1 in OA patients, this latter patient group demonstrates an even balance of SP-positive and CGRP-positive NFs (Fig. 3A). This was completely different in patients with RA, who presented a median of 0.06, which represents 16.7 NFs positive for SP vs one CGRP-positive NF (Fig. 3A).

Density of sympathetic NFs and CGRP-positive NFs

Neurotransmitters of sympathetic NFs have an anti-inflammatory effect on arthritic inflammation when concentrations of these

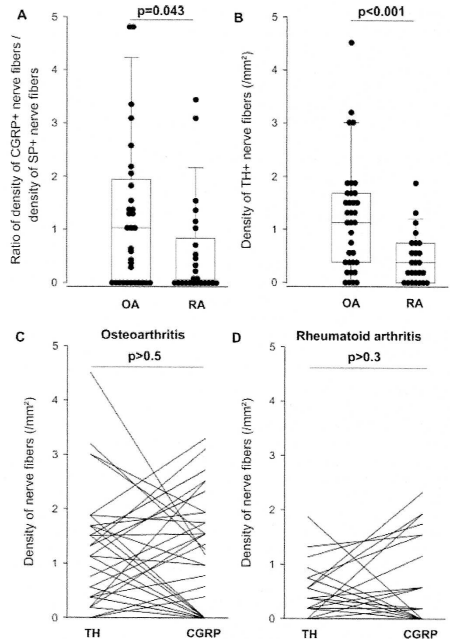


Fig. 3. Density of SP-positive NFs, CGRP-positive NFs and sympathetic NFs. (A) Comparison of the ratio of density of CGRP-positive NFs (numerator) divided by density of SP-positive NFs (denominator) in patients with OA and RA. (B) Comparison of TH-positive (sympathetic) NFs in patients with OA and RA. In panels (A) and (B), every symbol represents the value of one patient and box plots represent the 10th, 25th, 50th (median), 75th and 90th percentiles. Groups were compared by the Mann-Whitney U-test. (C and D) Direct comparison of the densities of TH-positive and CGRP-positive NFs in individual patients with OA (C) and RA (D). Every line represents the two values of an individual patient. Difference was tested using the Wilcoxon signed rank test for paired samples.

neurotransmitters are high enough to bind to β_2 -adrenergic receptors (and A2 adenosine receptors or μ -opioid receptors) [33]. In the investigated cohort of patients with chronic RA, density of sympathetic NFs was markedly lower than in OA patients (Fig. 3B). However, the direct comparison of the density of CGRP-positive NFs and sympathetic NFs did not reveal a significant difference in OA (Fig. 3C) and RA patients (Fig. 3D).

In addition, NF density of CGRP-positive NFs correlated positively with density of sympathetic NFs in OA (Fig. 4A) but not in RA patients (Fig. 4B).

Density of CGRP-positive NFs and parameters of inflammation or medication in RA and OA

In RA patients and OA controls, inflammatory parameters such as lining layer thickness, cellular density, T-cell density, macrophage density, vascularity or daily prednisolone (mg/day) did not correlate with the density of CGRP-positive NFs or with the ratio of CGRP-positive NFs to SP-positive NFs (data not shown). Only in RA patients, erythrocyte sedimentation rate

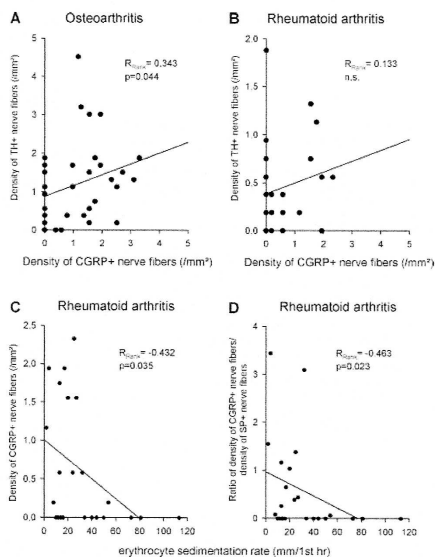


Fig. 4. Interrelation of the density of CGRP-positive NFs and TH-positive sympathetic NFs (A and B) and interrelation of erythrocyte sedimentation rate and CGRP-positive NFs (C) and the ratio of CGRP-positive NFs/SP-positive NFs (D). One symbol represents one individual patient. The panels give the linear regression line, the Spearman rank correlation coefficient and the respective *P*-value.

negatively correlated with density of CGRP-positive NFs (Fig. 4C) and the ratio of CGRP-positive NFs/density of SP-positive NFs (Fig. 4D). Only in RA patients, a similar trend existed for the interrelation between serum C-reactive protein and density of CGRP-positive NFs ($R_{\text{Rank}} = -0.406$, $P = 0.054$) and the mentioned ratio ($R_{\text{Rank}} = -0.382$, $P = 0.072$).

However, treatment with NSAIDs, prednisolone, methotrexate, hydroxychloroquine, sulphasalazine, azathioprine, leflunomide or tramadol was not associated with a high or low density of CGRP-positive NFs or with a high or low ratio of CGRP-positive NFs to SP-positive NFs (data not shown).

Discussion

In a large cohort of patients with chronic RA and OA, this study of synovial tissue demonstrated a preponderance of SP-positive NFs relative to CGRP-positive NFs in RA patients but not in OA. We investigated all NF types in the same patient in order to compare their density in a paired manner. The results most probably indicate a pro-inflammatory situation because the immunostimulating role of SP and the immunoinhibitory role of CGRP and sympathetic neurotransmitters have been demonstrated [5–18, 33]. In addition, a favourable influence of CGRP on bone resorption has been delineated due to inhibition of osteoclast activation [19, 20].

This study further shows that an even balance exists between SP-positive and CGRP-positive NFs in OA, but that a largely shifted balance away from CGRP to SP is present in RA (Fig. 3A). Indeed, in RA patients, ~17 SP-positive NFs match one CGRP-positive NF, whereas in OA patients, this ratio is

one to one (Fig. 3A). This uneven balance in RA patients surprisingly exceeds the recently described preponderance of SP-positive NFs over sympathetic NFs, which appeared as a ratio of ~8:1 [23]. Thus, local concentrations of important anti-inflammatory neurotransmitters such as CGRP from sensory NFs, and norepinephrine, adenosine and endogenous opioids from sympathetic NFs are inadequately low in relation to the pro-inflammatory SP from sensory NFs. These statements apply for patients with longer-lasting disease since we do not know the situation in early RA vs early OA. However, since in animal models the inflammation-related change of NFs occurred early in the disease process [28], similar changes might be expected in earlier phases of RA and OA.

These results suggest the existence of a differential regulation of CGRP and SP in sensory NFs, which probably depends on local and/or systemic inflammation (see the relation to erythrocyte sedimentation rate and fibre density as given in Fig. 4C and D). A differential release into the circulation of CGRP and SP has been demonstrated under activation of the sympathetic nervous system during exercise [34]. In this study, exercise induced a fast rise of plasma CGRP but not of plasma SP, which was interpreted as a vasodilation compensation for sympathetically induced vasoconstriction [34]. Another important study demonstrated that primary vagal sensory neurons produce more SP than CGRP in the presence of nerve growth factor and the opposite effect without nerve growth factor [35]. Although another study did not confirm the differential effect of nerve growth factor [36], additional circumstances together with nerve growth factor might be an important stimulus for the dysbalance of the two sensory neuropeptides. Since nerve growth factor is abundantly expressed in inflamed synovium [37–40], the observed preponderance of SP over CGRP might depend on the presence of this and other pro-inflammatory molecules.

Finally, we observed a positive correlation between the density of CGRP-positive and sympathetic NFs in OA, which we interpret as an anti-inflammatory signal due to the aforementioned effects of respective neurotransmitters. Such a positive correlation was not observed in synovial tissue of patients with RA, which demonstrates a markedly reduced presence of sympathetic NFs (*y*-axes in Fig. 4). Thus, in the less-inflamed tissue of OA patients, coupling of the two anti-inflammatory pathways might dampen the inflammatory process, a situation that is lost in the tissue of RA patients, indicating another example of neuroendocrine uncoupling.

In conclusion, the observed preponderance of SP-positive NFs over CGRP-positive and sympathetic NFs can be regarded as a pro-inflammatory signal, although the exact reasons for the differential behaviour of the two sensory neuropeptides SP and CGRP is presently not understood. A detailed analysis of the differential expression of SP and CGRP must include nerve growth factor together with typical pro-inflammatory cytokines such as TNF, and might unravel a new therapeutic approach in order to re-install the even balance of SP and CGRP in peripheral sensory NFs in RA.

Rheumatology key messages

- RA patients have a lower density of CGRP-positive NFs in relation to SP-positive NFs, which is not observed in OA patients.
- Density of CGRP-positive NFs correlates with density of sympathetic NFs in OA but not in RA patients.

Acknowledgement

Funding: This study was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Research Unit FOR696).

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

References

- Levine JD, Clark R, Devor M, Helms C, Moskowitz MA, Basbaum AI. Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science* 1984;226:547–9.
- Lotz M, Carson DA, Vaughan JH. Substance P activation of rheumatoid synovocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science* 1987;235:893–5.
- Mapp PJ, Kidd BL, Gibson SJ *et al.* Substance P-, calcitonin gene-related peptide- and C-flanking peptide of neuropeptide Y-immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis. *Neuroscience* 1990;37:143–53.
- Garrett NE, Mapp PJ, Cruwys SC, Kidd BL, Blake DR. Role of substance P in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1014–8.
- Wagner F, Fink R, Hart R, Danczyger H. Substance P enhances interferon-gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. *Regul Pept* 1987;19:355–64.
- Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988;241:1218–21.
- Wiedermann CJ, Wiedermann FJ, Apperl A, Kieselbach G, Konwalinka G, Braunsteiner H. In vitro human polymorphonuclear leukocyte chemokinesis and human monocyte chemotaxis are different activities of aminoterminal and carboxy-terminal substance P. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1989;340:185–90.
- Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA. Substance P selectively activates TNF- α gene expression in murine mast cells. *J Immunol* 1993;150:4476–85.
- Kavelaars A, Broeke D, Jourissen F *et al.* Activation of human monocytes via a non-neurokinin substance P receptor that is coupled to Gi protein, calcium, phospholipase D, MAP kinase, and IL-6 production. *J Immunol* 1994;153:3691–9.
- Serra MC, Calzetti F, Ceska M, Cassatella MA. Effect of substance P on superoxide anion and IL-8 production by human PMNL. *Immunology* 1994;82:63–9.
- Kincy-Cain T, Bost KL. Substance P-induced IL-12 production by murine macrophages. *J Immunol* 1997;158:2334–8.
- Tanabe T, Otani H, Mishima K, Ogawa R, Inagaki C. Mechanisms of oxyradical production in substance P stimulated rheumatoid synovial cells. *Rheumatol Int* 1996;16:159–67.
- Nong YH, Titus RG, Ribeiro JM, Remold HG. Peptides encoded by the calcitonin gene inhibit macrophage function. *J Immunol* 1989;143:45–9.
- Casini A, Geppetti P, Maggi CA, Surrienti C. Effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP), neurokinin A and neurokinin A (4–10) on the mitogenic response of human peripheral blood mononuclear cells. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1989;339:354–8.
- Torii H, Hosoi J, Beissert S *et al.* Regulation of cytokine expression in macrophages and the Langerhans cell-like line XS52 by calcitonin gene-related peptide. *J Leukoc Biol* 1997;61:216–23.
- Hosoi J, Murphy GF, Egan CL *et al.* Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 1993;363:159–63.
- Feng Y, Tang Y, Guo J, Wang X. Inhibition of LPS-induced TNF- α production by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages. *Life Sci* 1997;61:1–7.
- Fox FE, Kubin M, Cassin M *et al.* Calcitonin gene-related peptide inhibits proliferation and antigen presentation by human peripheral blood mononuclear cells: effects on B7, interleukin 10, and interleukin 12. *J Invest Dermatol* 1997;108:43–8.
- Zaidi M, Chambers TJ, Gaines DS RE, Morris HR, Macintyre I. A direct action of human calcitonin gene-related peptide on isolated osteoclasts. *J Endocrinol* 1987;115:511–8.
- D'Souza SM, Macintyre I, Giris S, Mundy GR. Human synthetic calcitonin gene-related peptide inhibits bone resorption in vitro. *Endocrinology* 1986;119:58–61.
- Ahmed M, Bjurholm A, Schultzberg M, Theodorsson E, Kreicberg A. Increased levels of substance P and calcitonin gene-related peptide in rat adjuvant arthritis. A combined immunohistochemical and radioimmunoassay analysis. *Arthritis Rheum* 1995;38:699–709.
- Miller LE, Josten HP, Schölmreich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 2000;14:2097–107.
- Weidner C, Holzer C, Harbuz M *et al.* Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis* 2005;64:13–20.
- Weihe E, Nohr D, Schäfer MK *et al.* Calcitonin gene related peptide gene expression in collagen-induced arthritis. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:1015–9.
- Pereira da Silva JA, Carmo-Fonseca M. Peptide containing nerves in human synovium: immunohistochemical evidence for decreased innervation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1990;17:1592–9.
- Konttinen YT, Rees R, Hukkanen M *et al.* Nerves in inflammatory synovium: immunohistochemical observations on the adjuvant arthritis rat model. *J Rheumatol* 1990;17:1586–91.
- Kimberly CL, Byers MR. Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin gene-related peptide and axonal sprouting. *Anat Rec* 1988;222:289–300.
- Imai S, Tokunaga Y, Konttinen YT, Maeda T, Hukuda S, Santavirta S. Ultrastructure of the synovial sensory peptidergic fibers is distinctively altered in different phases of adjuvant induced arthritis in rats: ultrastructural characterization combined with morphometric and immunohistochemical study for substance P, calcitonin gene related peptide, and protein gene product 9.5. *J Rheumatol* 1997;24:2177–87.
- Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol* 1997;159:5654–60.
- Hastings RH, Hua XY. Expression of calcitonin gene-related peptide by cultured rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:563–9.
- Bresnahan B, Cunnane G, Youssef P, Yanni G, Fitzgerald O, Mulherin D. Microscopic measurement of synovial membrane inflammation in rheumatoid arthritis: proposals for the evaluation of tissue samples by quantitative analysis. *Br J Rheumatol* 1996;37:636–42.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315–24.
- Straub RH, Häile P. Sympathetic neurotransmitters in joint inflammation. *Rheum Dis Clin North Am* 2005;31:43–59, viii.
- Lind H, Brudin L, Lindholm L, Edvinsson L. Different levels of sensory neuropeptides (calcitonin gene-related peptide and substance P) during and after exercise in man. *Clin Physiol* 1996;16:73–82.
- MacLean DB, Bennett B, Morris M, Wheeler FB. Differential regulation of calcitonin gene-related peptide and substance P in cultured neonatal rat vagal sensory neurons. *Brain Res* 1989;478:349–55.
- Lindsay RM, Lockett C, Sternberg J, Winter J. Neuropeptide expression in cultures of adult sensory neurons: modulation of substance P and calcitonin gene-related peptide levels by nerve growth factor. *Neuroscience* 1989;33:53–65.
- Manni L, Lundberg T, Fiorito S, Bonini S, Vigneti E, Aloe L. Nerve growth factor release by human synovial fibroblasts prior to and following exposure to tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and cholecystokinin-8: the possible role of NGF in the inflammatory response. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:617–24.
- Haliliday DA, Zettler C, Rush RA, Scicchitano R, McNeil JD. Elevated nerve growth factor levels in the synovial fluid of patients with inflammatory joint disease. *Neurochem Res* 1998;23:919–22.
- Falcini F, Malucchi CM, Lombardi A *et al.* Increased circulating nerve growth factor is directly correlated with disease activity in juvenile chronic arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996;55:745–8.
- Aloe L, Tuvet MA, Carcassi U, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;35:351–5.

8 Danksagung

Danken möchte ich besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. Straub für die Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung.

Herzlichen Dank auch an das Team im Labor und insbesondere an Dr. Silvia Capellino für die Unterstützung und stetige Hilfestellung.

Meinen Eltern für die Unterstützung während meines Studiums und dieser Arbeit.

Meiner Frau Carolin für die viele Geduld und die aufmunternden Worte.

9 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name	Matthias Dirmeier
Geburtsdatum/ -ort	31.05.1984 in Schwandorf
Familienstand	verheiratet
Anschrift	Obere Bachgasse 12 93047 Regensburg
Telefon	0176/23221820
E-mail	matthias@dirmeier.info

SCHULBILDUNG

1990 – 1994	Grundschule Wackersdorf
1994 – 2003	Gymnasium Schwandorf

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

2003-2009	Medizinstudium an der Universität Regensburg
12/2009	Approbation als Arzt

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

seit 02/2010	Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin I am Caritas Krankenhaus St. Josef in Regensburg
--------------	--

Regensburg, den 24. Januar 2011

Matthias Dirmeier